

Die frühe postnatale Entwicklung des Keimepithels
der Ratte unter dem Einfluß von Kallikrein

von
Ralph Stuttmann
aus
Köln

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. J. W. Rohen

Die frühe postnatale Entwicklung des Keimepithels der Ratte unter dem Einfluß von Kallikrein

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Ralph Stuttmann

aus

Köln

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr.Dr. J.W. Rohen

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.1979

Inhaltsübersicht

A. Einleitung und Literaturübersicht

B. Material und Methoden

- 1) Tierversuch
- 2) Sammlung des Materials und Aufarbeitung
- 3) Untersuchungsang und Methoden der Morphometrie
- 4) Statistik

C. Ergebnisse

- 1) Beschreibung der morphologischen Veränderungen der Keimstränge in der frühen postnatalen Entwicklungsperiode
- 2) Quantitative Veränderungen der Sertolischen Stützzellen
- 3) Quantitative Auswertung der Gonozytenproliferation während der postnatalen Entwicklung des Rattenhodens
- 4) Quantitative Auswertung der Spermatozytenprophasen im Keimepithel bei 12-15 Tage alten Ratten

D. Diskussion

E. Zusammenfassung

A. Einleitung und Literaturübersicht

Kallikrein wurde vor mehr als 50 Jahren von E.K. Frey entdeckt und in der Therapie eingeführt. Lange Jahre sah man die Wirkung dieses Enzyms ausschließlich in einer Gefäßerweiterung und Blutstrombeschleunigung. Neuerdings sind jedoch noch zahlreiche andere Wirkungen des Kallikreins, die auf einer Freisetzung von Kininen (Bradykinin, Kallidin etc.) aus inaktiven Vorstufen der Kininogene beruht (s. Fritz, 1978), bekannt geworden (s. Haberland und Rohen, Kallikrein-Symposien I 1973, II 1975a, III 1975b, IV 1977). Im vorliegenden Zusammenhang ist die Beobachtung von Rixon und Whitfield (1972 und 1973) an Thymus- und Knochenmarkzellen, sowie von Rohen und Peterhoff (1975) an Darmepithelzellen von besonderem Interesse, daß Kallikrein in physiologischen Dosen eine proliferationsfördernde Wirkung auf diese Zellsysteme hat. Diese Befunde wurden auch an anderen Populationen (Rabes, 1975 + 1977) sowie an menschlichen Fibroblasten in vitro (Schachtschabel und Rohen, 1975) bestätigt.

Es lag daher nahe, die Wirkung des Kallikrein-Kinin-Systems auf das Keimepithel zu untersuchen, da ja bekanntlich das generative Epithel der männlichen Keimdrüse eine besonders hohe proliferative Aktivität besitzt.

Die Spermatogenese ist ein äußerst komplexer, vom Lebensalter und von verschiedenen hormonellen Faktoren abhängiger Prozess (vgl. Holstein und Schirren, 1977, Roosen-Runge, 1969). Die Entwicklung und Ausstoßung der Samenzellen findet im engsten Zusammenhang mit den Stütz- und Sertolizellen des Hodens oder Sertolizellen statt, die jedoch keineswegs nur mechanische Aufgaben haben, sondern auch

wichtige Funktionen für die Ernährung, Differenzierung und Ausreifung der Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden erfüllen (Schulze, 1974, Schulze et al., 1976). Wachstum und Differenzierungsvorgänge des Keimepithels der Ratte sind häufig untersucht worden (Hilscher, B., Hilscher, W. et Maurer, 1969, Hilscher, W., Hilscher, B., 1969, Clermont et Huckins, 1961, Clermont et Leblond, 1953, Perey, Clermont et Leblond, 1961, Bustos-Obregon, 1970). Clermont und Leblond (1952) haben die Differenzierung der Samenzellen bei der Ratte in 14 aufeinanderfolgende Stadien eingeteilt, basierend auf den morphologischen Veränderungen der Spermatiden während der Spermatohistogenese.

Die Spermatogenese kann bei der adulten Ratte in 3 Abschnitte unterteilt werden. 1. die Spermatogoniogenese, 2. die Spermatocyto-genese und 3. die Spermatohistogenese (Hilscher, B., 1968, Hilscher, W., 1969, Clermont, 1962).

Spermatogoniogenese: Während dieser Phase findet vor allem die Proliferation der Spermatogonien im Keimepithel statt. Dieser Abschnitt läßt sich noch einmal in eine regenerierende Reihe, Erneuerung des Stammzellpools und proliferierende Reihe, Bildung der verschiedenen Spermatogonien, unterteilen. Es findet die Entwicklung der A_1 - zu A_4 -Spermatogonien statt. In 2 weiteren Proliferationsschritten entstehen aus den A_4 -Spermatogonien die Im-Spermatogonien und B-Spermatogonien. Letztere entwickeln sich in einem weiteren Teilungsschritt zu ruhenden Spermatozyten, womit die Spermatogoniogenese abgeschlossen ist.

Die Regeneration der A_1 -Spermatogonien kann sich von A_1 -, A_4 - oder Im-Spermatogonien ableiten. Auf die in dieser Frage bestehende Diskussion soll hier nicht weiter eingegangen werden. Als Zyklus-Dauer wird die Zeit vom Ende der A_1 -Spermatogonien Mitosen bis zum Ende der zeitlich

nachfolgenden A_1 Mitosen an derselben Stelle des Samenkanälchens definiert. Die Zyklusdauer beträgt minimal 5,6 Tage und maximal 12,8 Tage (Hilscher, B., 1968, Hilscher, W., 1969), je nachdem wo die Weichenstelle zwischen regenerierender und proliferierender Reihe zwischen A_1 - und Im-Spermatogonien angenommen wird. Der Differenzierungsprozess reicht vom Ende der A_1 -Spermatogonien Mitosen bis zum Ende der nachfolgenden B-Spermatogonien Mitosen an derselben Stelle des Kanälchens; die Dauer beträgt 8,6 Tage.

Spermatozytogenese: In diesen Abschnitt der Spermatozytogenese vom Ende der B-Spermatogonien Mitose bis zum Ende der II. Reifeteilung fällt die Ruhephase der Spermatozyten oder Prämeiose, die in die lange Phase der Meiose übergeht. Die Meiose beginnt mit dem Auftreten der Spermatozytenprophasen, mit leptotän-, zygotän-, pachytän-, diplotän- und Diakinese Stadium und endet mit der II. Reifeteilung. Die Dauer der Spermatozytogenese beträgt 20,45 Tage (Hilscher, W., 1969).

Spermatohistogenese: Mit dem Auftreten der Spermatiden beginnt die Spermatohistogenese, die mit der Abgabe der Spermatozoen in die Kanälchenlichtung endet. Die Dauer der Spermatohistogenese wurde mit 22,2 Tagen bestimmt (Hilscher, W., 1969).

Aus den hier wiedergegebenen Daten läßt sich die Gesamtdauer der Spermatogenese bei der erwachsenen Ratte angeben. Sie umfaßt 1. das Zeitintervall vom Ende der A_1 Mitosen bis zur Abgabe der Spermatozoen in die Kanälchenlichtung gleich 51,2 Tagen und 2. die Generationszeit der A_1 -Spermatogonien bzw. die Zyklusdauer, die minimal 5,6 Tage und maximal 12,8 Tage beträgt.

Während der Spermatogenese bleibt die Zahl und Verteilung der Sertolizellen entlang der Basalmembran in allen Entwicklungsabschnitten konstant (Bustos-Obregon, 1970). Als Zeichen der funktionellen Belastung der Sertolizellen ändert sich ihre Morphologie in Abhängigkeit der Zyklusstadien (Brökelmann, 1963).

In der vorliegenden Untersuchung umfaßte der beobachtete Zeitraum einen frühen Abschnitt des 1. Spermatogenesezyklus neugeborener Ratten. In mehreren Arbeiten ist die Entwicklung beginnend mit dem 15. Schwangerschaftstag beschrieben (Hilscher, B., Hilscher, W., Delbrück et Lerouge-Benard, 1972, Hilscher, W. et Makoski, 1968, Clermont et Perey, 1957, Clermont et Huckins, 1961).

Die Hodenanlage beim Rattenfetus erfolgt etwa am 14. Tag der Gravidität. Von diesem Zeitpunkt an wird die Entwicklung des Samenepithels in 2 große Abschnitte unterteilt, die Präspmatogenese und die Spermatogenese (Hilscher, W. et Makoski, 1968). Die Präspmatogenese kann nach Hilscher weiter in eine pränatale und eine postnatale Phase gegliedert werden. Zu Beginn der pränatalen Phase füllen 2 Zellarten die primitiven Keimstränge aus, Gonozyten als Mutterzellen der Keimzellei und Stützzellen als Vorläufer der Sertolizellen. Diese Gonozyten I. Ordnung durchlaufen bis zum 19. Fetaltag eine Proliferationsphase. An deren Ende treten sie als Gonozyten II. Ordnung in eine Ruheperiode ein, die bis in die postnatale Phase der Präspmatogenese reicht. Am 4.-5. Lebenstag beginnen die Gonozyten II. Ordnung eine zweite Proliferationswelle, die mit dem Auftreten der A-Spermatogonien das Einsetzen der Spermatogenese bedeutet (Hilscher, B. et al., 1972, Hilscher, W. et al., 1969). Im histologischen Bild zeigen die Gonozyten vor ihrer Teilung eine bemerkenswerte Schwellung der Zellkerne mit Auflockerung und Vergrößerung

der Chromatinstruktur. Die Veränderungen korrelieren mit einer Zunahme von DNS und nukleären Proteinen. Bei diesen Kernen handelt es sich wahrscheinlich um G 2-Phasenkerne. Während der ersten vier Lebenstage wurden nach dem histologischen Bild auch Degenerationsprodukte der Gonozyten beschrieben mit Kernvergrößerung, Auflösung der Kernmembran, Nucleolenverlust etc. (Hilscher, W. et al., 1967, Clermont et al., 1957).

Die zu Beginn der Spermatogenese auftretenden A-Spermatogonien entwickeln sich bis zum 8. Lebenstag über die Im-Spermatogonien zu B-Spermatogonien, deren Tochterzellen, die ruhenden Spermatozyten, bei ihrem Auftreten den Anfang der Spermatozytogenese am 8. - 10. Lebenstag festlegen.

Ab dem 10. Lebenstag treten die ruhenden Spermatozyten in die lange Prophase der 1. Reifeteilung ein. Nach dem 15. Lebenstag zeigt das Wiederauftreten der verschiedenen Spermatogonien-Arten nahe der Basalmembran die Entwicklung des 2. Zyklus an. Damit liegen vergleichbare Verhältnisse wie bei adulten Ratten vor. Zwischen dem 25. und 27. Tag wird durch das Auftreten der 2. Reifeteilung und Spermatiden, Ende der Spermatozytogenese und Anfang der Spermatohistogenese festgelegt. Am 45. Lebenstag werden die ersten reifen Spermatozoen in die Kanälchenlichtung abgegeben, womit der 1. Spermatogenesezyklus endet. Die Stützzellen durchlaufen parallel zur Entwicklung der Keimzellen eine Proliferationsphase, die in der pränatalen Periode der Prä-spermatogenese am 15. Fetaltag nach der Hodenanlage beginnt und in der 3. Lebenswoche endet (Hilscher, W. et al., 1967, Clermont et al., 1957, Nagy, 1971, Steinberger, A. et Steinberger, E., 1971). Im histologischen Bild beschreibt Clermont Teilungsbilder bis zum 18. Lebenstag. Hilscher et al. weist auf Verwechslungsmöglichkeiten der Sertolizellmitten hin. Bei Markierungsversuchen der Sertolizellen

mit H_3 -Thymidin bei jungen Ratten vom 1.-56. Lebenstag wird ein bis zum 56. Lebenstag auf 0 ständig abnehmender Prozentsatz markierter Sertolizellen beobachtet (Nagy, 1972). Die stärkste Abnahme liegt hierbei in der 2. Lebenswoche, was mit den histologischen Beobachtungen der lebhaften Proliferation in dieser Phase vereinbar ist.

Somit fallen Einsatz der Spermatozytogenese und Ende der Proliferation der Sertolizellen zusammen. Die lichtmikroskopischen Veränderungen der Stützzellen bis zur 6. Lebenswoche sind im Vergleich zu den ersten Lebenstagen gering. In der 7. Lebenswoche verwandeln sie sich innerhalb weniger Tage zu typischen Sertolizellen (Clermont, 1957).

Bei Untersuchungen über die Wirkung pharmakologischer Substanzen auf das Keimepithel muß aber auch die Blut-Testis-Schranke, die 1967 vom Korman und Setchel beschrieben worden ist, berücksichtigt werden. Danach lassen sich an den Tubuli seminiferi 2 Kompartimente unterscheiden, und zwar 1. das basale Kompartiment zwischen Basalmembran und den Haftplatten der Sertolizellen, in denen in der Hauptsache die Spermatogonien der verschiedenen Arten untergebracht sind und 2. das adluminale Kompartiment, das von den desmosomalen Strukturen bis zum Lumen der Hodenkanälchen reicht und in dem sich die Spermatogenese vollzieht. Experimentelle Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, daß zwischen dem interstitiellen Bindegewebe des Hodens (Hodenstroma), den Basalmembranen und dem basalen Kompartiment keine echte Schranke existiert (vgl. Dym und Fawcett, 1970), so daß man annehmen muß, daß alle biologischen Prozesse, die im Zusammenhang mit der Regeneration und der Entwicklung der Stammzellen stehen, direkt von im Plasma kreisenden Substanzen beeinflußt werden können, während die Spermatogenese selbst direkt von dort aus nicht zu erreichen ist.

Es lag daher nahe, zuerst die Wirkung des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Sertolizellen, über die ja der gesamte Stoffwechsel zwischen Samenzellen und Organismus gehen muß, zu prüfen. In verschiedenen Versuchsserien haben Rohen und Buschhüter (1975) sowie Leidel und Mitarbeiter (1975) bewiesen, daß durch die Kallikrein-Gaben die Aktivität der Sertolizellen zu beeinflussen ist, was einer indirekten Wirkung dieses Enzyms auf die Spermatogenese gleichkäme.

In der vorliegenden Untersuchung sollte nun vor allem auch geklärt werden, ob darüberhinaus auch auf die Samenzellbildung und die Samenzellreifung ein direkter Effekt durch die genannten Substanzen existiert. Das Modell der frühen postnatalen Entwicklung des Keimepithels schien für diese Fragestellung besonders geeignet, da am unausgereiften Hoden die frühen Entwicklungsstadien der einzelnen, zum Teil sehr differenzierten Zellpopulationen des Hodens noch gut voneinander zu unterscheiden sind.

B. Material und Methoden

Die frühe postnatale Entwicklung der Spermatogenese unter dem Einfluß von Kallikrein wurde an insgesamt 240 jungen Sprague-Dawley-Ratten vom 3.-35. Tag p.p. untersucht. Es wurden 2 Gruppen gebildet: Gruppe A enthielt 120 Ratten, die mit Kallikrein behandelt wurden, Gruppe B umfaßte ebenfalls 120 männliche Ratten als Kontrolle. Um diese große Zahl von Tieren zu gewinnen, wurden in 4 Serien mit je zwischen 16 und 25 Einzeltieren insgesamt 76 weibliche Tiere gedeckt. Dabei waren die Muttertiere mindestens 3 Monate alt mit einem Gewicht von 175-220 g. 3 Versuchsreihen wurden in den Sommermonaten Juni-August durchgeführt, während die letzte im Januar folgte. Zur Befruchtung wurde ein Tierpaar jeweils am Abend zusammen-

gebracht und nach 3 Tagen wieder getrennt. Als Befruchtungszeit wurde der der 1. Nacht folgende Tag angenommen. Während der Tragzeit befanden sich alle Muttertiere in Einzelkäfigen mit der üblichen Ernährung, die auch während der Entwicklungszeit der Jungtiere unverändert blieb. Für alle Tiere bestanden gleiche Umgebungstemperaturen und vergleichbare Lichtverhältnisse. Wie aus anderen Versuchen bekannt war, beträgt die Tragzeit bei Ratten 21-23 Tage. Zur erwarteten Geburtszeit wurden die Tiere in kurzen Abständen kontrolliert, um die Geburt zu erfassen. Der Geburtstag wurde im Versuchszeitplan als Tag 0 bezeichnet. Bei allen Würfen wurden unabhängig von der Zahl sowohl männliche als auch weibliche Jungtiere bei dem Muttertier belassen, um die physiologischen Verhältnisse zu erhalten.

Außerdem wurden die im Versuchszeitraum anfallenden Gewichtsunterschiede der Jungtiere zur Berechnung der Kallikreindosis bewertet, ansonsten aber nicht berücksichtigt. Eine Ausnahme bilden einige Jungtiere, die nachdem sie über 2 Tage keine Gewichtszunahme zeigten und gegenüber den Geschwistern in der Entwicklung zurückblieben, getötet und aus dem Versuch ausgeschlossen wurden. In allen 4 Serien wurden nach der Geburt die Würfe so den Gruppen A und B zugeteilt, daß nach Möglichkeit die gleiche Anzahl von Jungtieren für die Gruppen A + B vorlagen.

An dem der Geburt folgenden Tag 1 des Versuchszeitplanes wurde mit der Behandlung der Jungtiere begonnen. Dabei wurden in der Gruppe A vom 1. bis zum 20. Tag täglich 100 Einheiten gereinigtes Schweinepankreas-Kallikrein pro kg Körpergewicht in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. injiziert. Gruppe B erhielt im

gleichen Zeitraum in gleicher Applikationsform als Kontrolle täglich 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung. Hochgereinigtes Pankreas-Kallikrein vom Schwein mit 1180 Einheiten/mg wurden uns freundlicherweise von der Firma Bayer/Leverkusen zur Verfügung gestellt. Verwendet wurden Tuberkulinspritzen und kleinste Kanülen. Die absolute Menge Kallikrein (0,5 - 1 Einheit/Tier) war bei dieser Dosierung gering, die Tiere wurden bei der Injektion nicht narkotisiert.

Material

Vom 3. Lebenstag an wurden täglich bis zum 20. Lebenstag, dann am 27. und 35. Lebenstag in den Gruppen A und B je 6 Tiere in Ätherrausch getötet. Ein Hoden pro Tier wurde entnommen, in 2,5%iger Glutaraldehydlösung fixiert und für die EM-Auswertung weiterverwendet. Vor der Entnahme des 2. Hodens wurde das Herz punktiert und der Kreislauf mit Stievescher Lösung durchspült, um eine optimale Fixierung zu erreichen. Anschließend wurde der 2. Hoden ebenfalls entnommen und in Stievescher Lösung weiterfixiert. Dieses Material war für die lichtmikroskopische Untersuchung bestimmt und wurde nach den üblichen Methoden weiterverarbeitet. Nach der Einbettung in Paraffin wurden ca. 5 μ dicke Schnitte angefertigt. Folgende Färbemethoden fanden Verwendung: PAS, van Gieson, Eisenhämatoxin nach Heidenhain. Für einen bestimmten Abschnitt der Auswertung, die Beurteilung der Spermatozytenprophasen, wurde eine spezielle Schnittfolge erforderlich. So wurden die Hoden der 12 - 15 Tage alten Ratten beider Gruppen in Serie folgendermaßen geschnitten: ca. in Hodenmitte mit einer Schnittdicke von ca. 5 μ wurden 16 Serienschnitte erstellt und von dieser Serie jeweils die 4. Schnitte auf einem Objektträger gemeinsam aufgezogen. So repräsentiert eine solche Stufenschnittserie eine Hodenschnittdicke von ca. 80 - 100 μ .

Für die Lichtmikroskopie wurde das Forschungsmikroskop M 20 der Fa. Wild, erweitert mit einem Zeichentubus und ein beleuchteter Mattscheibentisch der Fa. Kontron verwendet. Die Mattscheibe war für die Auflage von Rasterfolien verschiedener Feldgrößen bestimmt, deren Gitter über den Zeichentubus in das mikroskopische Bild eingespiegelt werden konnte. Für einen Teil der Auswertung, der Bestimmung des Tubulusdurchmessers, wurde mit einer Hilfseinrichtung dem Schnittbild eine Skala eingeblendet, die zur Längenmessung geeignet war und nach Eichung eine Umrechnung der Meßgröße auf μm erlaubte.

Folgende Untersuchungen wurden an diesem Material durchgeführt:

1.) Es wurden am 3. Lebenstag beginnend täglich in beiden Gruppen bis zum 13. Tag, am 15. Tag, vom 17.-20. Tag und am 27. Tag die Sertolizellen pro Tubulusquerschnitt gezählt und der entsprechende Tubulusdurchmesser mit Hilfe der erwähnten Skala gemessen. Dabei wurden nur ideale Kanälchenquerschnitte bestimmt. Bei der Sertolizellenzählung wurden bei Zellüberlagerungen jeweils 2 Zellkerne gewertet, wenn sich die Kerne um weniger als die Hälfte überlagerten. Kernfragmente fanden keine Berücksichtigung. Pro Tier kamen mehrere Schnitte zur Auswertung, die Zahl der gemessenen Tubuli konnte dabei sowohl von Schnitt zu Schnitt, als auch bei den Tieren einer Gruppe schwanken. An einem Untersuchungstag kamen aber immer alle Tiere einer Gruppe zur Auswertung.

2.) Vom 3.-7. Lebenstag wurden die Gonozyten an mindestens 2 Hodenquerschnitten pro Versuchstier in beiden Gruppen bestimmt. Es wurde der Leuchttisch mit Gitterplatte verwendet. Durch Verschieben der Präparate unter dem über-

blendeten Raster konnte pro Schnitt 20x auf einer Einzelfläche von $0,0256 \text{ mm}^2$ (Kantenlänge $0,16 \text{ mm}$), insgesamt bei 2 ausgewerteten Präparaten also auf einer Gesamtfläche von $1,024 \text{ mm}^2$ die Gonozytenzahl bestimmt werden. Dabei diente der fast immer mitgeschnittene Nebenhoden als Orientierungshilfe, um einen oberen und unteren Hodenpol festzulegen. So begann bei Schnitt 1 die kantendeckende Verschiebung der Einzelfläche vom oberen Pol, bei Schnitt 2 vom unteren Pol jeweils in Richtung Hodenmitte. Erwies sich ein Schnitt als zu klein, wurden zusätzlich weitere ausgewertet, was jedoch nur in wenigen Fällen notwendig war. Sinn dieses Vorgehens war, auf verschiedenen Schnitten nicht 2x die gleiche Fläche auszuwerten. Gonozyten, die in die Zellteilung eingetreten waren, wurden nicht berücksichtigt.

3.) Vom 12.-15. Lebenstag wurden in beiden Gruppen die Spermatozytenprophasen an jeweils 4 Serienschnitten pro Hoden, die mit einem Schnittabstand von ca. 20μ aufeinander folgten, zahlenmäßig erfaßt. Es wurde wieder der Leuchttisch mit Rasterplatte verwendet. Das Raster bestand aus 225 quadratischen Einzelfeldern mit einer realen Kantenlänge von $21,3 \mu$ entsprechend der Vergrößerung des Mikroskops (20x) und Einstellung des Zeichentubus. Pro Querschnitt wurde dieses Gitter von 225 Einzelfeldern 10x ausgewertet, an 4 Schnitten also insgesamt 9 000 Kleinrasterfelder, was einer Gesamtfläche von $4,08 \text{ mm}^2$ entspricht. Nun wurden alle die Kleinrasterfelder gezählt, die überhaupt Prophasen von Spermatozyten enthielten, wobei deren Anzahl unerheblich war. Befand sich mindestens eine Zelle in den Feldgrenzen, wurde dieser Raster als "getroffen" bewertet. Felder, auf deren Grenzen Prophasen lagen, wurden einfach gezählt. Um der ungleichmäßigen Verteilung der Reifeteilungen gerecht zu werden, wurde der größte Schnittdurchmesser gesucht, von diesem ausgehend das

Präparat 10x kantendeckend unter dem eingespiegelten Raster verschoben und so auf einer zusammenhängenden Fläche die Zahl der Einzelraster mit Prophasen bestimmt.

4.) Am 15. Lebenstag wurde zusätzlich die absolute Zahl der Spermatozytenprophasen in beiden Gruppen ausgewertet. Das Vorgehen entsprach demjenigen unter 3.

Statistik

Als statistisches Verfahren wurden bei der Auswertung des Zahlenmaterials der Sertolizellzählung eine einfache Datenbeschreibung gewählt. Zur Signifikanzermittlung der Gonozyten- und Spermatozytenprophasenzahlen wurde der Rang-Test oder Wilcoxon-Test verwendet mit folgenden Grundlagen (Pfanzagl, 1968).

Rang-Test (oder Wilcoxon-Test)

Gegeben seien zwei voneinander unabhängige Stichproben

$$(X_1, X_2, \dots, X_{n_1})$$

$$(Y_1, Y_2, \dots, Y_{n_2})$$

Hypothese ist, daß beide Stichproben aus derselben Verteilung stammen.

Tests für dieses Zweistichprobenproblem, die nicht Normalverteilung voraussehen, aber, falls doch Normalverteilung vorliegt, eine wesentlich höhere Effizienz haben, ergeben sich durch Verwendung von Rangzahlen.

Vorgehensweise:

Die beiden Stichproben werden zu einer vereinigten Stichprobe zusammengefaßt. Sodann werden die Beobachtungen X_i bzw. Y_i der Größe nach angeordnet und durchnummeriert, so daß dann die Rangzahl K die Nummer der Beobachtung ist. Die kleinste Beobachtung hat die Rangzahl 1, die größte die Rangzahl $n = n_1 + n_2$.

Als Testgröße dient die Summe der Rangzahlen der ersten Stichprobe: R_1 . Die Hypothese wird abgelehnt, wenn die Summe zu groß oder zu klein ist.

Man berechnet den Erwartungswert der Rangsumme R_{1ERW} . Dieser ist

$$\frac{n_1 \cdot (n_1 + n_2 + 1)}{2}$$

Dabei bedeutet n_1 den Umfang jener Stichprobe, auf die sich die Rangsumme R_1 bezieht. Sodann bildet man die Differenz

$$R - \frac{n_1 (n_1 + n_2 + 1)}{2}$$

Diese Differenz muß zwischen $\pm c$ liegen, wobei der Wert c aus den beiden (d.h. je nach Signifikanzniveau) Tabellen entnommen wird. Ist

$$R_1 - \frac{n_1 (n_1 + n_2 + 1)}{2} \geq c \text{ oder } R_1 - \frac{n_1 (n_1 + n_2 + 1)}{2} \leq -c,$$

so ist der Unterschied zwischen beiden Stichproben signifikant. Interessiert man sich nur für Abweichungen nach einer Richtung, so wird man nur die eine dieser beiden Relationen als relevant für die Signifikanzbestimmungen ansehen. Die in den Tabellen angegebenen c -Werte garantieren bei zweiseitiger Anwendung eine Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 1% bzw. 5%, bei einseitiger Anwendung von höchstens 0,5% bzw. 2,5%.

Da es wegen

$$\frac{R_1 - n_1 (n_1 + n_2 + 1)}{2} = - \frac{(R_2 - n_2 (n_1 + n_2 + 1))}{2}$$

gleichgültig ist, für welche der beiden Stichproben man den Wert R berechnet, wird man bei Stichproben unterschiedlicher Größe R stets für die kleinere Stichprobe errechnen.

Wilcoxon-Test 95%

4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	n_2 n_1
—	—	—	—	8,0	9,0	10,0	10,0	11,0	12,0	13,0	2
—	7,5	8,0	9,5	10,0	11,5	12,0	13,5	14,0	15,5	16,0	3
8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	13,0	15,0	16,0	17,0	18,0	19,0	4
9,0	10,5	12,0	12,5	14,0	15,5	17,0	18,5	19,0	20,5	22,0	5
15	47,5	13,0	15,0	16,0	17,0	19,0	20,0	22,0	23,0	25,0	6
14	46,0	48,0	16,5	18,0	19,5	21,0	22,5	24,0	25,5	27,0	7
13	43,5	45,0	47,5	19,0	21,0	23,0	25,0	26,0	28,0	29,0	8
12	41,0	43,0	45,0	47,0	22,5	25,0	26,5	28,0	30,5	32,0	9
11	38,5	40,0	42,5	44,0	46,5	27,0	29,0	30,0	32,0	34,0	10
10	36,0	38,0	40,0	42,0	43,0	45,0	30,5	33,0	34,5	37,0	11
9	33,5	35,0	37,5	39,0	40,5	42,0	44,5	35,0	37,0	39,0	12
8	31,0	33,0	34,0	36,0	38,0	39,0	41,0	42,0	38,5	41,0	13
7	28,5	30,0	31,5	33,0	34,5	36,0	37,5	39,0	40,5	43,0	14
6	26,0	27,0	29,0	30,0	32,0	33,0	34,0	36,0	37,0	38,0	39,0
5	23,5	24,0	25,5	27,0	28,5	30,0	30,5	32,0	33,5	35,0	35,5
4	20,0	21,0	23,0	24,0	25,0	26,0	27,0	28,0	29,0	30,0	32,0
3	17,5	18,0	19,5	20,0	21,5	22,0	23,5	24,0	25,5	26,0	27,5
2	14,0	15,0	15,0	16,0	17,0	18,0	18,0	19,0	20,0	21,0	22,0
n_1 n_2	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

Tabellen

Wilcoxon-Test 99%

4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	n_2 n_1
—	—	—	—	—	13,5	15,0	16,5	17,0	18,5	20,0	3
—	—	12,0	14,0	15,0	17,0	18,0	20,0	21,0	22,0	24,0	4
—	12,5	14,0	15,5	18,0	19,5	21,0	22,5	24,0	25,5	28,0	5
15	61,5	16,0	18,0	20,0	22,0	24,0	26,0	27,0	29,0	31,0	6
14	59,0	62,0	20,5	22,0	24,5	26,0	28,5	30,0	32,5	34,0	7
13	55,5	58,0	61,5	25,0	27,0	29,0	31,0	33,0	35,0	38,0	8
12	53,0	55,0	58,0	61,0	29,5	32,0	33,5	36,0	38,5	41,0	9
11	49,5	52,0	54,5	57,0	59,5	34,0	36,0	39,0	41,0	44,0	10
10	46,0	49,0	51,0	53,0	56,0	58,0	39,5	42,0	44,5	47,0	11
9	42,5	45,0	47,5	50,0	52,5	54,0	56,5	44,0	47,0	50,0	12
8	40,0	42,0	44,0	46,0	48,0	50,0	52,0	54,0	50,5	53,0	13
7	36,5	38,0	40,5	42,0	44,5	46,0	48,5	50,0	51,5	56,0	14
6	33,0	35,0	36,0	38,0	40,0	42,0	44,0	45,0	47,0	49,0	51,0
5	29,5	31,0	32,5	34,0	35,5	37,0	38,5	41,0	42,5	44,0	45,5
4	25,0	27,0	28,0	30,0	31,0	32,0	34,0	35,0	37,0	38,0	40,0
3	20,5	22,0	23,5	25,0	25,5	27,0	28,5	29,0	30,5	32,0	32,5
2	—	—	—	—	19,0	20,0	21,0	22,0	23,0	24,0	25,0
n_1 n_2	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

Die angegebenen Sicherheitswahrscheinlichkeiten gelten bei zweifacher Anwendung. Für $n_1 + n_2 > 30$ gilt:

$$c_\alpha \approx \lambda'_{\alpha} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}, \text{ mit } \lambda'_{\alpha} = \begin{cases} 1,96 & \text{für } \alpha = 95\% \\ 2,58 & \text{für } \alpha = 99\% \end{cases}$$

Beispiel für das praktische Vorgehen beim vorliegenden Zahlenmaterial der Spermatozytenprophasenzählung am 13. Lebenstag.

Beide Stichproben, entsprechend den Gruppen A + B,

Gruppe A: Tier 1-6	Gruppe B: Tier 1-6
165	2
216	5
273	5
292	17
410	44
627	45

werden zu einer Stichprobe zusammengefaßt mit Rangverteilung

2	1. Rang	Rang 1 - 6 entspricht
5	2. "	den Werten der Gruppe B
5	3. "	und entspricht Stich-
17	4. "	probe 1
44	5. "	
45	6. "	
165	7. Rang	Rang 7 - 12 entspricht
216	8. "	den Werten der Gruppe A
273	9. "	und entspricht Stich-
292	10. "	probe 2
410	11. "	
627	12. "	

Die Rangzahlen aus Stichprobe 1 werden nun addiert ($1+2+3+4+5+6 = 21$) und es ergibt sich die Rangzahl $K_1 = 21$.

Sodann berechnet man den Erwartungswert der Rangsumme R_1 ERW nach der oben angegebenen Formel

$$R_1 \text{ ERW} = \frac{n_1 \cdot (n_1 + n_2 + 1)}{2} = 39$$

Dann bildet man die Differenz $R_1 - R_1 \text{ ERW}$

$$21 - 39 = -18$$

Nun muß

$$R_1 - R_1 \text{ ERW} \geq c \text{ oder } R_1 - R_1 \text{ ERW} \leq -c$$

sein.

Die Größe c wird der Tabelle zum Wilcoxon-Test entnommen und ist bei $n_1 = 6$ und $n_2 = 6$ 16

$$-18 \leq -16$$

Die Zahlen unterscheiden sich signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%.

Um diese Betrachtung bei dem vorliegenden Zahlenmaterial übersichtlich zu gestalten, wurden die Zahlenwerte pro Einzeltier und Gruppe bei der Gonozyten- und Spermatozytenzählung an jedem Untersuchungstag in Einzeldiagrammen gegenübergestellt.

Dadurch wird bei der Gonozytenzählung sofort ersichtlich, daß bis auf Tag 5 alle Werte der Gruppe A größer sind als die Werte der Gruppe B und sich immer eine Signifikanz des Ergebnisses mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt.

Für Tag 5 ergibt sich folgende Rangverteilung:

B	47	1. Rang
B	60	2. "
A	66	3. "
B	74	4. "
B	76	5. "
B	79	6. "
B	82	7. "
A	119	8. "
A	126	9. "
A	129	10. "
A	133	11. "
A	187	12. "

Stichprobe 1 entspricht Gruppe B. Nun wird wieder die Rangzahl R_1 der Stichprobe B durch Addition der einzelnen Ränge ermittelt $(1+2+4+5+6+7) = 25$

$$R_1 = 25$$

Differenz $R_1 - R_1 \text{ ERW}$ bei $R_1 \text{ ERW} = 39$

$$= - 14$$

$c = 13$ bei 5% Irrtumswahrscheinlichkeit

$$14 < - 13$$

⇒ Signifikanz des Ergebnisses mit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit.

Bei der graphischen Einzeldarstellung der Ergebnisse der Spermatozytenzählung vom 12. - 15. LT wird ersichtlich, daß alle Werte der Gruppe A an jedem Tag über den Werten der Gruppe B liegen, und sich somit nach Anwendung dieses Testverfahrens immer eine Signifikanz der Ergebnisse mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt.

C. Ergebnisse

I. Die morphologischen Veränderungen der Keimstränge in der frühen postnatalen Entwicklungsperiode unter dem Einfluß von Kallikrein

1. Drei Tage nach der Geburt

Bei den 3 Tage alten mit Kochsalz behandelten Ratten (Kontrollgruppe B) beherrschen 2 Zellarten das mikroskopische Bild der Keimstränge. In palisadenartiger Anordnung liegen polymorphe, ovoide, keulenförmige Zellen der Tubuluswand eng an. Bei diesen Zellen handelt es sich um die Vorläufer der Sertolizellen. Die Kernmembran ist deutlich erkennbar, der Chromatingehalt der Zellkerne ist relativ gering. Meist sind ein oder mehrere grobe Nukleolen vorhanden. Es können sämtliche Mitosestadien differenziert und eindeutig den Stützzellen zugeordnet werden.

Von diesen Zellen kann eine zweite Art unterschieden werden, die Urgeschlechtszellen oder Gonozyten. Ihre Kerne sind ungefähr doppelt so groß wie die der Stützzellen. Die Kernmembran ist dünn aber klar ausgebildet und der Chromatingehalt gering. Jeder Kern enthält etwa 1-4 Nucleolen. Einige Urgeschlechtszellen scheinen sich auch im Stadium der Degeneration zu befinden. Die Kernmembran löst sich auf, Nucleolen fehlen und das Karyoplasma scheint zu zerfließen. Oft bleiben nur Kernschatten zurück. Kernteilungsfiguren findet man in diesem Stadium noch nicht.

2. Vier Tage nach der Geburt

Am 4. Lebenstag beginnen im Samenepithel entscheidende strukturelle Veränderungen. Abgesehen von den unverändert erscheinenden Gonozyten vergrößern sich jetzt einige Urgeschlechtszellen, ihre Kerne schwellen an und zeigen eine Auflockerung des Chromatins, das insgesamt heller, aber

auch gröber erscheint. Außerdem erkennt man sehr große Zellteilungsfiguren mit plumpen Chromosomen, die in der Kanälchenmitte liegen und als Gonozytenmitosen identifiziert werden können.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß bei der Ratte die Spermatogenese am 4. Lebenstag einsetzt. In dieser Hinsicht ergab sich zwischen den beiden Versuchsgruppen kein wesentlicher Unterschied. Sowohl in der mit Kallikrein behandelten Versuchsserie als auch in der Kontrollgruppe tauchten am 4. Lebenstag die ersten Gonozytenmitosen auf.

3. Fünfter Tag nach der Geburt

Am 5. Lebenstag betreffen die Veränderungen des Keim-epithels wiederum vorwiegend die Geschlechtszellen. Die Lage der Gonozyten ist jetzt aber nicht mehr immer zentral, sondern einige Kerne lagern sich auch peripher an die Basalmembran an. Generell hat die Zahl der Gonozytenmitosen zugenommen. Zusätzlich erkennt man jetzt eine neue Zellart, die A-Spermatogonien, die ersten Tochterzellen der Gonozyten. Ihre Kerne, meist rund oder oval, lassen sich größtmäßig zwischen den Gonozyten und den Sertolizellen einordnen. Der Chromatingehalt dieser A-Spermatogonien ist deutlich größer als der der Gonozyten und immer ungleichmäßig über den Kern verteilt. Es findet sich mindestens ein wechselnd großer Nucleolus sowie verschiedene Chromatinverdichtungen an der Kernmembran, wodurch die Zellen morphologisch sehr uneinheitlich aussehen.

Auch wird jetzt eine Tendenz der Keimzellen erkennbar, sich an die Tubuluswand anzulegen. Die vorher weitgehend geschlossene Sertolizellschicht wird jetzt immer wieder von Gonozyten als auch von A-Spermatogonien unterbrochen, die sich zwischen die Stützzellen hineingeschoben haben. Die A-Spermatogonien bleiben teils nach peripherer Zellteilung nah an der Basalmembran liegen, teils verschoben

sie sich auch erst nach einer zentralen Mitose in Richtung Basalmembran. Die A-Spermatogonien liegen meist einzeln oder paarweise zusammen. Bei der Durchsicht der Präparate der mit Kallikrein behandelten Gruppe gewinnt man den Eindruck, daß die Gonozyten-Mitosen zahlreicher geworden sind, was durch die späteren morphometrischen Befunde bestätigt wird.

4. Sechster und Siebenter Tag nach der Geburt

Am 6. Lebenstag ließ sich in der Kallikreingruppe eine starke Gonozytenabnahme beobachten.

Vom 7. Lebenstag an ließ sich nun noch eine weitere Zellart abgrenzen, die Im-Spermatogonien, Tochterzellen der A-Spermatogonien. Diese Spermatogonienart ist den A-Spermatogonien ausgesprochen ähnlich. Die Kernform ist rund bis längsoval. Die Längsachse der Kerne ist vielfach radiär zur Tubulusmitte hin orientiert und das Chromatin ist flockenartig über den Kern verteilt. Die Kernmembran zeigt daher meist diskrete Chromatinauflagerungen und der Nucleolus eine zackenreiche Randstrukturierung. Eine genaue Unterscheidung der Im-Spermatogonien von den A-Spermatogonien ist oft nicht möglich. Als Ausdruck einer intensivierten mitotischen Aktivität finden sich jetzt gehäuft Teilungsfiguren in den Keimsträngen. Vereinzelt treten auch noch Gonozyten, deren Zahl aber weiter abnimmt, in die Mitose ein, stets erkennbar an ihrem charakteristischen Aussehen. Nahe der Basalmembran finden sich viele Teilungsfiguren, die man nach Größe und Lage der Stammzellen zuordnen muß. Die kleineren Mitosen entstammen den Sertolizellen und treten relativ regelmäßig über alle Tubuli seminiferi verteilt auf, während die größeren Mitosen, die den A-Spermatogonien und Im-Spermatogonien zugeordnet werden, häufig auch in Gruppen zusammenliegen.

In der mit Kallikrein behandelten Gruppe A sind die Gonozyten fast völlig verschwunden. Spermatogonien der charakterisierten Arten treten annähernd in allen Tubuli auf. In der Kontrollgruppe hat die Gonozytenzahl vor allem zwischen dem 6. und 7., sowie dem 7. und 8. Lebenstag deutlich abgenommen.

5. Achter und Neunter Tag nach der Geburt

Am 8. Lebenstag treten in der Kallikreingruppe nun erstmalig auch B-Spermatogonien auf, Tochterzellen der Im-Spermatogonien. Die B-Spermatogonien lassen sich eindeutig von allen anderen Spermatogonienarten unterscheiden. Sie haben einen runden Zellkern und dichte, schollenartige Chromatinablagerungen an Kernmembran und Nucleolus. Sie werden auch als Krustenspermatogonien bezeichnet und liegen hauptsächlich peripher in Nähe der Basalmembran.

Am 9. Lebenstag lassen sich B-Spermatogonien auch in der Kontrollgruppe differenzieren. Bei den meisten Spermatogonien handelt es sich in beiden Gruppen um A-Spermatogonien und Im-Spermatogonien, die in fast allen Tubuli vorkommen. Dabei liegen immer noch viele Spermatogonien in der Tubuluslichtung. Die zentralen Mitosen gehören wahrscheinlich zu diesen Zellen. In der Kallikreingruppe läßt sich nur vereinzelt noch eine weitere Zellart differenzieren. Das Chromatin der etwas kleineren, runden Zellkerne ist, ähnlich den B-Spermatogonien, dicht und krustenartig, so daß diese Zellen kompakter erscheinen. Es handelt sich um ruhende Spermatozyten, Tochterzellen der B-Spermatogonien. Mitunter bereitet die Unterscheidung der B-Spermatogonien von ruhenden Spermatozyten Schwierigkeiten.

6.) 10. bis 35. Tag nach der Geburt

Am 10. Lebenstag enthalten die Keimstränge in der Kallikreingruppe (Gruppe A) vermehrt B-Spermatogonien mit vorwiegend peripherer Lagerung. Die Spermatozyten liegen vielfach in Nachbarschaft oder über den B-Spermatogonien, mehr in Richtung zur Tubulusmitte hin. Bei den Tieren der Kontrollgruppe werden nun ebenfalls ruhende Spermatozyten gefunden.

Am 11. Lebenstag zeigt das Keimepithel bei der Kallikreingruppe weitere Entwicklungsfortschritte. In einigen Tubulusabschnitten sind die Spermatozyten jetzt in die Prophase der Meiose eingetreten und haben ihr Aussehen in auffälliger Weise verändert. Ihr Kernchromatin verteilt sich gleichmäßig über die fast runden, relativ kleinen Zellkerne, die auf diese Weise leicht von allen anderen Zellarten unterschieden werden können.

Die Zahl der leptotaenen und zygotanen Spermatozyten nimmt am 12. Lebenstag in der Kallikreingruppe sichtbar zu. In der Kontrollgruppe erkennt man erst ganz vereinzelte Prophasen, hauptsächlich aber B-Spermatogonien und ruhende Spermatozyten.

Am 13. Lebenstag sind Spermatozytenprophasen in der Kallikreingruppe zahlreicher geworden. In der Kontrollgruppe tauchen die frühen Phasen der Meiose erst jetzt in größerer Anzahl auf.

Bis zum 15. Lebenstag entwickeln sich in der Kallikreingruppe dann pachytaene Spermatozyten, in dem zellärmeren Keimepithel der Kontrollgruppe jedoch erst am 16. Lebenstag.

Gleichzeitig mit der Spermatozytenentwicklung entwickelt sich eine Schichtung der Zellen innerhalb des Keimepithels. Die innere Schicht bilden die Spermatozytenprophasen. Mehr zur Basalmembran hin liegen in einem pallisadenartigen Wall die Sertolizellen. Die verschiedenen Spermatogoniengenerationen werden dicht an der Tubuluswand gefunden. In den entsprechenden Entwicklungsstadien entstehen nahe der Basalmembran aus B-Spermatogonien ruhende Spermatozyten, die sich, bevor sie in die Meiose eintreten, zwischen die Sertolizellen schieben und so die Tubuluslichtung erreichen. Im Keimepithel erkennt man zahlreiche Mitosen, die immer eine bestimmte Spermatogonienart betreffen und fast ausschließlich in Gruppen zusammenliegen. In der mittleren Schicht der Sertolizellen treten nur vereinzelt Zellteilungen auf.

Übereinstimmend mit Hilscher läßt sich das Keimepithel bis zum 20. Lebenstag zu 6 typischen Zellverbänden ordnen, die alle A-Spermatogonien und Spermatozyten enthalten, sich aber hinsichtlich des gemeinsamen Auftretens bestimmter Spermatogonien-Arten und der verschiedenen Spermatozyten unterscheiden. Zellverband 1 enthält A-Spermatogonien und pachytaene Spermatozyten. Bei Typ 2 liegen neben den A-Spermatogonien auch einige Im-Spermatogonien, bei Typ 3 B-Spermatogonien und bei Typ 4 schließlich auch ruhende Spermatozyten zusammen mit pachytaenen Spermatozyten in einem Tubulusbereich. Diese 4 Typen sind weiter entwickelt als die 2 folgenden, wo über A-Spermatogonien einmal leptotaene und bei Typ 6 zygotaene Spermatozyten liegen.

Am 20. Lebenstag befinden sich Spermatozyten unterschiedlicher Entwicklungsstadien in allen Tubuli.

Reifeteilungen werden am 27. Lebenstag in beiden Gruppen beobachtet. Am 35. Lebenstag erkennt man die ersten Präspmatiden.

II. Quantitative Veränderungen der Sertoli'schen Stützzellen unter dem Einfluß von Kallikrein

Die Anzahl der Sertolizellen pro Tubulusquerschnitt sowie der jeweilige Tubulusdurchmesser in beiden Versuchsgruppen wurde in den Zeitabschnitten vom 3. bis 13. Lebenstag, am 15., vom 17. bis 20. sowie am 27. Lebenstag bestimmt. Generell zeigte sich eine stetige Zunahme der Sertolizellzahl und ein parallel dazu verlaufendes Dickenwachstum der Tubuliseminiferi. Signifikante Unterschiede zwischen den Kallikrein behandelten und den Kontrolltieren ergaben sich jedoch nicht (s. Tab. 1 a + b, 2 a + b und Diagramm 1). Das stärkste Anwachsen der Stützzellzahlen lag bei behandelten und unbehandelten Tieren zwischen dem 9. und 17. Lebenstag, vom 17. bis 20. Lebenstag sowie zwischen dem 20. und 27. Lebenstag wurde nur noch eine geringe Zunahme der Zellzahl beobachtet. Auch in diesem Verhalten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Der Durchmesser der Tubuli blieb bis zum 9. Lebenstag nahezu unverändert, um dann gleichmäßig bis zum 20. Lebenstag zuzunehmen. Der Vergleich dieser Werte mit den am 27. Lebenstag gefundenen zeigt, daß sich diese Wachstumstendenz auch später noch in annähernd gleicher Form fortsetzt. Signifikante Unterschiede im Tubuluswachstum ergaben sich im allgemeinen nicht.

III. Quantitative Auswertung der Gonozytenproliferation während der postnatalen Entwicklung des Rattenhodens unter dem Einfluß von Kallikrein

Bei der zahlenmäßigen Auswertung der in den vorigen Kapiteln beschriebenen Präparate von den ersten 7 Lebenstagen der Ratte wurden folgende Beobachtungen gemacht (vgl. Tab. 3). Zahlreiche Gonozyten zeigen in den ersten 7 Lebenstagen vergrößerte Kerne mit undeutlicher Kernmembran und teilweise Membranverlust, so daß nur noch Kernschatten sichtbar sind. Diese Veränderungen werden im allgemeinen als Degenerationsvorgänge angesehen. Die Spermatogenese setzt generell am 4. Lebenstag mit den Gonozytenmitosen ein.

Das Keimepithel der mit Kallikrein behandelten Ratten entwickelt sich rascher, die Gonozyten degenerieren eventuell nur in geringer Zahl und die gleichzeitige Entwicklung der Spermatogonien läuft schneller und gleichmäßiger ab.

In der Kontrollgruppe bleiben die Gonozyten dagegen länger nachweisbar und die Spermatogenese kommt langsamer und im Vergleich nur zögernd in Gang.

Durch die Zählung der Gonozyten auf einer Hodenquerschnittsfläche von $1,024 \text{ mm}^2$ pro Versuchstier vom 3. bis 7. Lebenstag an, sollten diese Veränderungen auch quantitativ erfaßt werden. Über die ermittelten Werte pro Tier und den jeweiligen Durchschnitt informiert Tab. 3. Eine graphische Darstellung gibt Diagramm 2.

In der Kallikreingruppe wird ein fast gleichmäßiger Abfall der Gonozytenzahlen bis zum 7. Tag deutlich, während in der NaCl-Gruppe das Ergebnis nicht so einheitlich ausfällt. Hier bleibt am 3., 4. und 6. Tag die Gonozytenzahl fast gleich, um dann erst am 7. Tag abzunehmen. Am 5. Tag wird der Wert ermittelt, der annähernd dem 7. Tag entspricht. Eine Aussage

Über die Signifikanz dieser Ergebnisse läßt sich unter Anwendung des Wilcoxon- oder Rang-Testes machen. Aufgrund dieses Testes läßt sich sagen, daß mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% an den Tagen 3,4,6 und 7 das Zahlenmaterial der Versuchsgruppe von dem der Kontrollgruppe signifikant verschieden ist. Für den 5. Untersuchungstag wurde das gleiche Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% errechnet.

IV. Quantitative Auswertung der Spermatozytenprophasen im Keimepithel bei 12 bis 15 Tagen alten Ratten unter dem Einfluß von Kallikrein

Am 11. Lebenstag erscheinen in der mit Kallikrein behandelten Versuchsgruppe bereits vereinzelt Spermatozytenprophasen. Die rasche und auffallend starke Zunahme der frühen Meiosestadien, die sich bereits lichtmikroskopisch erkennen ließ, gab im Vergleich zu den Kontrolltieren den Anstoß, diesen Effekt auch morphometrisch zu erfassen. Es wurden vom 12. bis 15. Tag die relativen Zahlen der Spermatozytenprophasen mit der weiter oben beschriebenen Methode bestimmt und außerdem die absolute Zahl der Spermatozyten, die am 15. Tag vorhanden war, bestimmt. Über die erhaltenen Werte informiert Tab. 4. Die hier angegebenen Zahlen entsprechen der Summe aller Kleinquadrate auf 4 mm^2 , die Spermatozyten enthalten. Zusätzlich wird der Durchschnittswert einer Gruppe für jeden Untersuchungstag aufgeführt. Die zusammenfassende graphische Darstellung der Befunde bringt Diagramm 3.

Am 12. Lebenstag treten in der Kallikrein-Gruppe sprunghaft vermehrt die Spermatozyten in die Reifeteilung ein. Annähernd die gleichen Zahlenwerte werden am 13. Lebenstag ermittelt. Erst jetzt entwickeln sich in der Kontrollgruppe einige Spermatozytenprophasen. Am 14. und 15. Lebenstag läßt sich eine konstante Zunahme der frühen Phasen der Reifeteilung in beiden Versuchsgruppen beobachten, jedoch zeigt die Kallikrein-Gruppe allgemein höhere Absolutwerte. In der Entwicklung des Keimepithels bestehen jedoch bei den Einzeltieren einer Gruppe erhebliche Unterschiede. Nach Anwendung des Wilcoxon-Tests sind die Ergebnisse mit $p = 0,01$ signifikant.

Die Zählung der Quadrate mit Prophasen gibt durch die ermittelte Zahl X ($X_{\max} = 9\,000$ pro Tier) nur ein relatives Maß der tatsächlichen Zellzahl, da in jedem Kleinquadrat eine, aber auch mehrere, Spermatozytenmeiosen liegen können. Da am 15. Lebenstag die Gesamtzahl der Prophasen anstatt der gewählten Quadrate bestimmt wurde, kann für diesen Untersuchungstag die Spermatozytenzahl pro Quadrat errechnet werden. Der Wert beträgt für die Kallikrein-Gruppe 1,34 pro Quadrat, für die Kontrollgruppe 1,36, ist also annähernd gleich. Diagramm 4 und Tab. 5 zeigt die tatsächlichen Spermatozytenzahlen am 15. Lebenstag in beiden Gruppen. Die Werte der Kallikreingruppe sind wiederum signifikant höher (Wilcoxon-Test mit $p = 0,01$) als in der Kontrollgruppe.

Die Entwicklung der leptotaenen, zygotaaenen und pachytaaenen Spermatozyten entspricht den Entwicklungsstadien IX - XIV der Stadieneinteilung nach Clermont u. Leblond (1953) bei der erwachsenen Ratte. Diese Stadieneinteilung ist durchaus auf die junge Ratte übertragbar (Clermont, 1957). Über diesen Abschnitt (12.-15. Lebenstag) kann für den 15. Tag folgende Feststellung gemacht werden: bei gleicher Zelldichte pro Flächeneinheit in den Gruppen A und B muß in der Kallikreingruppe das Keimepithel in mehr Tubulusabschnitten in diese Entwicklungsphase eingetreten sein, um die höheren Werte zu begründen. Die Spermatozyten I. Ordnung lassen sich in festen Zahlenverhältnissen ihren Stammzellen, ruhenden Spermatozyten, B-Spermatogonien, Im-Spermatogonien und A-Spermatogonien zuordnen. Daher ist das Ergebnis der Zahlen der Spermatozytenprophasen sowohl mengen- als auch zeitmäßig abhängig von den Entwicklungsschritten ihrer Vorläuferzellen, den Spermato gonien.

Die mögliche Beeinflussung dieser Verbindung soll weiter unten besprochen werden.

Diskussion

Eine Erklärung für das frühzeitigere und stärkere Auftreten der Spermatozytenteilungsfiguren in den mit Kallikrein behandelten Versuchsgruppen kann vielleicht im Verhalten der Gonozyten gesucht werden. Nach Hilscher und Makoski (1968) nimmt die Zahl der Gonozyten bei Ratten in den letzten Schwangerschaftstagen sowie in den ersten 3-4 Lebenstagen kontinuierlich ab. Danach tritt ein Teil dieser Zellen am 3.-6. Lebenstag in die S-Phase und anschließend in die Mitose ein. Die Tochterzellen wandeln sich in A-Spermatogonien um. Mit dem Auftreten der ersten A-Spermatogonien endet die Praespermato-genese und die eigentliche Spermatogenese beginnt. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich, daß die Zahl der Gonozyten in der Kallikrein-Gruppe in den ersten Lebenstagen wesentlich über der der Kontrollgruppe liegt.

Betrachtet man die Entwicklung des Keimepithels in diesem Untersuchungsabschnitt, so laufen 2 Vorgänge nebeneinander ab: 1. degenerieren in den ersten Lebenstagen eine Reihe von Gonozyten und 2. entstehen durch Zellteilungen vom 4. Lebenstag ab in unserem Material mit dem Einsetzen der Spermatogenese aus einer Urgeschlechtszelle 2 A-Spermatogonien, wobei das morphologische Äquivalent der Gonozyten verschwindet.

Es erhebt sich nun die Frage, auf welche Weise das Kinin-freisetzende Enzym Kallikrein die beobachteten Veränderungen an der Gonozytenpopulation bewirkt. Nimmt man an, daß die physiologische Degeneration der Gonozyten in den ersten Lebenstagen durch Kallikreingaben gehemmt wird oder daß andererseits die Zahl der Gonozyten in der Phase der Praespermato-genese unmittelbar vermehrt wird, so resultiert in beiden Fällen daraus für die weitere postnatale Entwicklung ein

größeres Ausgangsvolumen an teilungs- und differenzierungsfähigen Zellen. Nimmt man an - wofür die meisten der vorliegenden Befunde sprechen - daß die Spermatogenese innerhalb des adluminalen Kompartiments der Hodenkanälchen nach einem bestimmten, genau festgelegten, Zeitplan abläuft (vgl. Rosen-Runge, 1962, 1969), so ist nicht zu erwarten, daß durch äußere Einflüsse diese streng determinierte "Uhr" verstellt werden kann. Es ist jedoch durchaus denkbar, daß die Zahl der Spermatozyten dadurch erhöht werden kann, daß von vorneherein mehr Zellen in den Teilungs- und Differenzierungszyklus eintreten, wie das in der frühen postnatalen Entwicklung bei unseren Versuchstieren der Fall gewesen zu sein scheint. Darüberhinaus scheint aber auch eine indirekte Beeinflussung der Samenzellenreifung durch eine Stimulierung der Sertolizellen durch das Kallikrein-Kinin-System und damit eine Verbesserung der Qualität der ausgereiften Spermatozoen möglich zu sein, was sich aus den vorliegenden Versuchen jedoch vorerst noch nicht beweisen läßt.

Brökelmann (1962) verbindet Veränderungen an Sertolizellen erwachsener Ratten mit den verschiedenen Zyklusstadien. Rohen und Buschhüter (1975) beschreiben Volumen und Kerngrößenzunahme der Sertolizellen unter Kallikreineinfluß (50 UK/Tier bzw. KgKG.) bei erwachsenen Ratten. Betrachtet man die Sertoli-Sertolizellverbindungen als wirksame Schranke, Stoffe aus dem adluminalen Kompartiment fern zu halten, so muß der Zellpool des adluminalen Kompartiments durch aktive Stoffwechselleistung der Sertolizellen, im Sinne der Ammenzelle, mit Nährstoffen versorgt werden. Diese Aufgabe wird parallel mit der Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke relevant. Vitale, Fawcett und Dym (1973) untersuchen die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke bei jungen Ratten. Zwischen dem 16.-19. Lebensstag führen die Sertoli-Sertolizellverbindungen zur

funktionellen Unterteilung des Tubuluslumens in basales und adluminales Kompartiment.

In diesem Zeitraum endet ebenfalls die Proliferationsphase der Sertolizellen. Auf der anderen Seite entwickelt sich der zweite Spermatogenesezyklus, wobei die Zellzahl im adluminalen Kompartiment sprunghaft ansteigt. Da im basalen Kompartiment sowohl Stammzellpool der Spermatozyten, als auch Sertolizellen direkt von im Blut kreisenden Substanzen beeinflußt werden können, ist ein additiver Effekt denkbar: 1) proliferationsfördernde Wirkung auf Spermatogonien. 2) Verbesserung der Stoffwechselfunktion der Sertolizellen mit besserer Ernährung der Zellen des adluminalen Kompartiments. Möglicherweise werden dadurch Degenerationsvorgänge adluminaler Zellen aufgehalten.

Nagy (1971) beschreibt die Aufnahme von markiertem (^3H) Thymidin in Sertolizellen bis zum 56. Tag nach der Geburt. Bis zu diesem Zeitpunkt haben sich die Stützzellen zu reifen Sertolizellen verwandelt und gleichzeitig erscheinen die ersten Spermatozoen mit ihrem lebhaften Stoffwechsel in der Tubuluslichtung. Es ist interessant, ob die Aufnahme von markierten Substanzen in die Sertolizellen während ihrer Reifungsperiode als auch später durch Kallikrein beeinflusbar ist.

Nach den z.Zt. vorliegenden Befunden erscheint wahrscheinlich, daß der Kallikreineffekt auf die Spermatogenese additiv ist; Wirkung auf Spermatogonienproliferation und Ernährungsfunktion der Sertolizellen.

Zusammenfassung

An einer Gesamtzahl von 240 Albino-Ratten im Alter von 3-35 Tagen, wurde der Einfluß von Kallikrein (tägliche intraperitoneale Injektion von 100 IEK/Kg KG) auf das Samenepithel gegenüber einer mit NaCl behandelten Kontrollgruppe lichtmikroskopisch und morphometrisch untersucht. Die Sertolizellen proliferieren vom 15. Tag der Gravidität bis ca. 18. Tag p.n. Vom 3. - 20. Tag p.n. konnte keine Veränderung der Proliferationsvorgänge der Sertolizellen und des Tubuluswachstums der mit Kallikrein behandelten Versuchsgruppe gegenüber den Kontrolltieren ermittelt werden. Die Spermatogenese beginnt mit den Gonozytenmitosen und dem Auftauchen ihrer Tochterzellen, den A-Spermatogonien, in beiden Gruppen am 4. Tag p.n. In der mit Kallikrein behandelten Versuchsgruppe treten die ruhenden Spermatozyten am 12. Lebenstag in die Meiose ein, in der Kontrollgruppe erst am 13. Lebenstag. Dabei liegt die Anzahl Meiosenprophasen pro Flächeneinheit bei den Versuchstieren vom 12.-15. Tag um mehr als das Doppelte über den Werten der Kontrolltiere. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß Kallikrein erstens eventuell in der Lage ist, die Degeneration der Gonozyten in der Präspmatogenese aufzuhalten, zweitens ein Einfluß auf die Proliferation der Spermatogonien in der frühen Spermatogenese möglich ist und drittens die Entwicklung der Zellen des adluminalen Kompartiments durch Beeinflussung des Stoffwechsels der Sertolizellen indirekt verbessert wird.

Literaturverzeichnis

Brökelmann, J.: Fine Structure of Germ Cells and Sertoli Cells During the Cycle of the Seminiferous Epithelium in the Rat. Z. Zellforsch. 59, 820-850, 1963.

Bustos-Obregon, E.: On Sertoli Cell Number and Distribution in Rat Testis. Arch. Biol. (Liège) 81, 99-108, 1970.

Clermont, Y. and B. Perey: Quantitative Study of the Cell Population of the Seminiferous Tubules in Immature Rats. Amer. J. Anat. 100, 241-267, 1957.

Clermont, Y.: Quantitative Analysis of Spermatogenesis of Rat: A revised model for the renewal of Spermatogonia. Amer. J. Anat. 111, 111-129, 1962.

Clermont, Y. and C. Huckins: Microscopic Anatomy of the Sex Cords and Seminiferous Tubules in Growing and Adult Male Albino Rats. Amer. J. Anat. 180, 79-97, 1961.

Clermont, Y. and C.P. Leblond: Renewal of Spermatogonia in the Rat. Amer. J. Anat. 93, 475-502, 1953.

Dym, M. and D.W. Fawcett: The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biol. Reprod. 3, 308-326, 1970.

Fritz, H.: Is there a specific kininogenase in human PMN granulocytes: 1) Failure to detect intrinsic kininogenase activity in PMN elastase - 2) Necessity of a critical consideration of the homogeneity of PMN proteases applied to biological assay system. Discussion remark in: Havemann, K., A. Janoff: Neural Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, im Druck.

Haberland, G.L. and J.W. Rohen (Eds.). 1973. Kininogenases I, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren and P. Huber (Eds.) 1975 a. Kininogenases II, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Haberland, G.L., J.W. Rohen, G. Blümel and P. Huber (Eds.). 1975 b. Kininogenases III, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Haberland, G.L., J.W. Rohen and T. Suzuki (Eds.). 1977. Kininogenases IV, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Hilscher, B., W. Hilscher und W. Maurer: Autoradiographische Untersuchungen über den Modus der Proliferation und Regeneration des Samenepithels der Wistaratte. Z. Zellforsch. 94, 593-604, 1969.

Hilscher, W. und B. Hilscher: Autoradiographische Untersuchungen über die Kinetik der Spermatogenese der Wistaratte unter besonderer Berücksichtigung der Spermazytogenese. Z. Zellforsch. 96, 625-640, 1969.

Hilscher, W. und H.-B. Makoski: Histologische und autoradiographische Untersuchungen zur "Präspmatogenese" und "Spermatogenese" der Ratte. Z. Zellforsch. 86, 327-350, 1968.

Hilscher, B., W. Hilscher, G. Delbrück und B. Lerouge-Bénard: Autoradiographische Bestimmung der S-Phasen-Dauer der Gonozyten bei der Wistaratte durch Einfach- und Doppelmarkierung. Z. Zellforsch. 125, 229-251, 1972.

Holstein, A.F. und C. Schirren: Morphologie menschlicher Samenkanälchen bei normaler und gestörter Spermatogenese. Urologe B 17, 1-14, 1977.

Kleeberg, S., R. Prinzen and W. Leidl: Effect of Kallikrein on the gonades of premature male rats. In: Kininogenases, Kallikrein 2, Internat. Symposion Mainz. G.L. Haberland, J.W. Rohen, C. Schirren and P. Huber (Eds.), Schattauer Verlag Stuttgart, 99-105, 1975.

Leblond, C.P. and Y. Clermont: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann. N.Y. Acad. Sci., 55, 548-573, 1952.

Nagy, F.: Cell Division Kinetics and DNA Synthesis in the Immature Sertoli Cells of the Rat Testis. J. Reprod. Fert. 28, 389-395, 1972.

Perey, B., Y. Clermont and C.P. Leblond: The wave of the seminiferous epithelium of the rat. Amer. J. Anat. 108, 47-48, 1961.

Pfanzagl: Allgemeine Methodenlehre der Statistik II, Sammlung Göschen, Berlin 1968.

Rabes, H.M: Influence of kallikrein on proliferation of liver cells in vivo and in vitro. 1975. In: G.L. Haberland, J.W. Rohen, G. Blümel and P. Huber (Eds.): Kininogenases III, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 137-146, 1975.

Rabes, H.M.: Proliferation kinetics of hepatocytes in regenerating rat liver after kallikrein injection. In: G.L. Haberland, J.W. Rohen and T. Suzuki (Eds.): Kininogenases IV, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 127-136, 1977.

Rixon, R.H., J.F. Whitfield: Kallikrein, Kinin and Cell proliferation. In: G.L. Haberland and J.W. Rohen (Eds.): Kininogenases I, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 131-145, 1973.

Rixon, R.H., J.F. Whitfield and J. Bayliss: The stimulation of mitotic activity in the thymus and bone marrow of rats by kallikrein. *Horm. Metab. Res.* 3, 279-284, 1972.

Rohen, J.W. and J. Peterhoff: Stimulation of mitotic activity by kallikrein in the gastrointestinal tract of rats. In: Haberland, G.L., J.W. Rohen: Kininogenases - Kallikrein I, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 57-66, 1975.

Rohen, J.W. and H. Buschhüter: Karyometric Measurements on the Sertoli Cell Nuclei in Kallikrein-treated Albino Rats. In: Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren and P. Huber (Eds.): Kininogenases II, Schattauer Verlag, Stuttgart-New York, 85-97, 1975.

Roosen-Runge, E.C.: The process of spermatogenesis in mammals. *Biol. Rev.* 37, 343-377, 1962.

Roosen-Runge, E.C.: Comparative aspects of spermatogenesis. In: *Biol. of Repr.* 1, 24-39, 1969.

Schachtschabel, D.O., J.W. Rohen: Influence of kallikrein on ³H-Thymidine incorporation into the DNA and on glycolysis of mammalian cell cultures. In: Haberland, G.L., J.W. Rohen, G. Blümel and P. Huber (Eds.): Kininogenases III, F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York, 221-226, 1975.

Schulze, C.: On the morphology of the human Sertoli cell. *Cell Tiss.* 153, 339-355, 1974.

Schulze, C., A.F. Holstein, C. Schirren and F. Körner: On the morphology of the human Sertoli cell under normal conditions and in patients with impaired fertility. *Andrologia* 8, 167-178, 1976.

Steinberger, A. and E. Steinberger; Replication Pattern of Sertoli Cells in Maturing Rat Testis in Vivo and in Organ Culture. *Biology of Reproduction* 1, 84-87, 1971.

Vitale, R., D.W. Fawcett and M. Dym: The Normal Development of the Blood-Testis Barrier and the Effects of Clomiphene and Estrogen Treatment. *Anat. Rec.* 176, 333-344, 1973.

Nagy, F.: The synthesis of DNA and nuclear protein by gonocytes in the testes of normal and Y-irradiated rats. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 18, 653-664, 1965.

Tab. 1a: Anzahl der Sertolizellen pro Tubulus mit Angabe der Anzahl bewerteter Tubuli, des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Konfidenzbereiches ($p = 0,05$),
Kallikrein-Gruppe

Tag	Anzahl bewerteter Tubuli	Mittelwert	Standardabweichung	Konfidenzbereich
3	120	19,1	2,31	18,7 - 19,5
4	120	18,1	2,42	17,7 - 18,6
5	120	18,2	2,31	17,8 - 18,6
6	70	17,6	2,50	17,0 - 18,2
7	100	21,9	2,33	21,5 - 22,4
8	40	21,7	2,23	21,0 - 22,4
9	40	24,4	2,65	23,5 - 25,3
10	40	25,9	3,02	24,9 - 26,9
11	40	26,4	2,92	25,5 - 27,3
12	40	27,6	3,30	26,5 - 28,7
13	60	30,8	2,82	30,0 - 31,5
15	60	30,2	3,40	29,3 - 31,0
17	60	35,5	3,25	34,7 - 36,4
18	96	34,7	2,37	34,3 - 35,2
19	96	35,9	3,17	35,2 - 36,5
20	96	38,8	4,35	37,9 - 39,7
27	80	39,9	4,84	38,8 - 41,0

Tab. 1b: Anzahl der Sertolizellen pro Tubulus mit Angabe
der Anzahl bewerteter Tubuli, des Mittelwertes,
der Standardabweichung und des Konfidenzbereiches.
Kontroll-Gruppe (p = 0,05)

Tag	Anzahl bewerteter Tubuli	Mittelwert	Standardabweichung	Konfidenzbereich
3	120	17,9	2,40	17,4 - 18,3
4	120	18,6	2,76	18,1 - 19,1
5	120	17,6	2,71	17,1 - 18,1
6	70	18,4	2,35	17,8 - 18,9
7	100	19,9	2,63	19,4 - 20,4
8	40	22,0	2,24	21,3 - 22,7
9	40	22,4	1,89	21,8 - 23,0
10	40	25,7	2,82	24,8 - 26,6
11	40	28,6	2,96	27,7 - 29,5
12	40	28,9	2,61	28,1 - 29,7
13	60	30,9	3,14	30,1 - 31,7
15	60	32,2	2,98	31,5 - 33,0
17	60	36,3	3,61	35,3 - 37,2
18	96	34,4	2,72	33,8 - 34,9
19	96	33,8	2,84	33,2 - 34,4
20	96	38,1	3,48	37,4 - 38,8
27	80	39,8	4,66	38,8 - 40,9

Tab. 2a: Tubulusdurchmesser in μm , mit Angabe der Anzahl bewerteter Tubuli, des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Konfidenzbereiches ($p = 0,05$)
Kallikrein-Gruppe

Tag	Anzahl bewerteter Tubuli	Mittelwert	Standardabweichung	Konfidenzbereich
3	120	47,3	3,41	46,7 - 47,9
4	120	47,6	4,26	46,8 - 48,3
5	120	45,8	3,70	45,1 - 46,4
6	70	47,8	3,64	46,9 - 48,7
7	100	48,3	3,37	47,6 - 48,9
8	40	47,9	2,59	47,1 - 48,7
9	40	51,6	2,75	50,7 - 52,5
10	40	50,7	3,19	49,7 - 51,7
11	40	56,6	3,67	55,5 - 57,8
12	40	63,2	3,34	62,1 - 64,2
13	60	64,5	3,74	63,6 - 65,5
15	60	68,8	4,79	67,6 - 70,1
17	60	80,4	5,74	78,9 - 81,9
18	96	81,0	4,76	80,1 - 82,0
19	96	89,5	5,14	88,4 - 90,5
20	96	94,8	9,68	92,8 - 96,7
27	80	145,5	9,13	143,4 - 147,5

Tab. 2b: Tubulusdurchmesser in μm , mit Angabe der Anzahl bewerteter Tubuli, des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Konfidenzbereiches ($p = 0,05$).
Kontroll-Gruppe

Tag	Anzahl bewerteter Tubuli	Mittelwert	Standardabweichung	Konfidenzbereich
3	120	48,9	3,46	48,2 - 49,5
4	120	47,0	4,10	46,2 - 47,7
5	120	44,8	3,76	44,1 - 45,4
6	70	46,9	2,99	46,2 - 47,6
7	100	48,8	2,71	48,2 - 49,3
8	40	49,2	2,40	48,5 - 50,0
9	40	50,2	2,96	49,2 - 51,1
10	40	55,0	4,43	53,6 - 56,4
11	40	54,4	3,74	53,2 - 55,6
12	40	58,1	4,82	56,6 - 59,7
13	60	60,7	3,63	59,7 - 61,6
15	60	62,4	5,21	61,1 - 63,8
18	96	86,0	5,12	84,9 - 87,0
19	96	82,1	5,77	80,9 - 83,3
20	96	88,0	7,33	86,5 - 89,5
27	80	130,0	7,71	128,2 - 131,7

Tab. 3 : Anzahl der Gonocyten von Tier 1-6 auf 1,024 mm² in den Gruppen A und B vom 3. bis zum 7. Tag p.p.

Gruppe A

Tag	3	4	5	6	7
Tier					
1	217	189	133	22	21
2	302	176	66	40	32
3	243	140	187	77	13
4	241	154	119	40	14
5	243	165	129	36	11
6	240	179	126	47	9
Mittelwert	248	167	126	43	17

Gruppe B

Tag	3	4	5	6	7
Tier					
1	123	136	76	130	58
2	119	131	60	156	67
3	138	108	47	97	91
4	148	109	79	110	84
5	112	111	74	93	67
6	127	130	82	95	78
Mittelwert	127	120	72	117	74

Tab. 4: Anzahl der Spermatocytenprophasen (Treffermethode)
von Tier 1-6 auf 4,08 mm² Meßfläche in den Gruppen
A und B am 12.-15. Lebenstag

Gruppe A

	Tier	1	2	3	4	5	6	Mittelwert
Tag								
12		124	81	212	564	547	502	338
13		282	411	232	231	216	627	333
14		623	595	648	544	634	661	617
15		1408	1186	1047	876	1036	773	1054

Gruppe B

	Tier	1	2	3	4	5	6	Mittelwert
Tag								
13		45	44	11	5	17	2	20
14		182	142	82	60	41	160	111
15		600	464	591	187	231	76	347

Tab. 5: Absolute Anzahl der Spermatocytenprophasen von
Tier 1-6 auf $4,08 \text{ mm}^2$ Meßfläche in den Gruppen
A und B am 15. Lebenstag

Gruppe A

	Tier	1	2	3	4	5	6	Mittelwert
Tag								
15		1520	1210	1613	1575	1483	1069	1411

Gruppe B

	Tier	1	2	3	4	5	6	Mittelwert
Tag								
15		872	643	645	177	406	99	475

Zahl der Stützzenllen pro Tubulus



Diagramm 1: Quantitative Veränderungen der Stützzenllzahlen pro Tubulusdurchmesser während der postnatalen Entwicklung des Rattenhodens (3.-27.Tag p.p.)

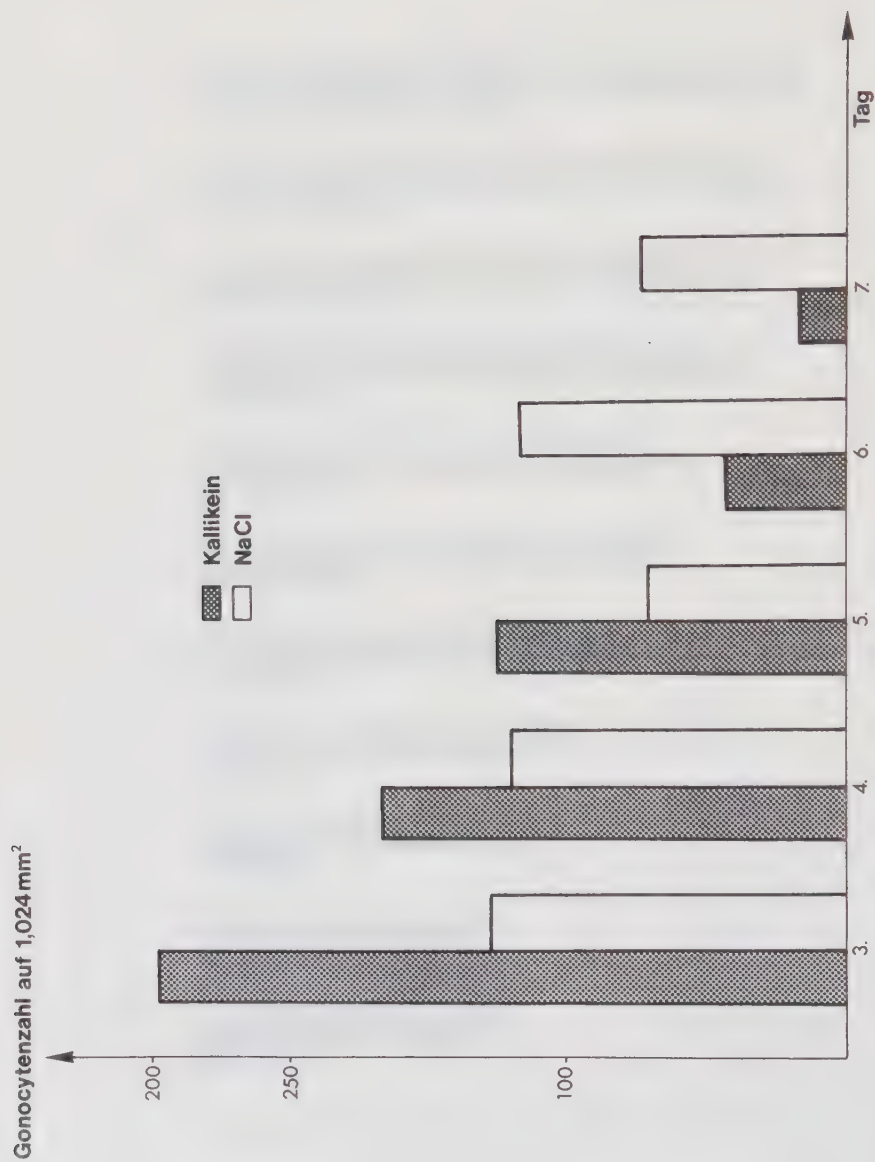


Diagramm 2: Anzahl der Gonocyten auf 1,024 mm² Hodenfläche bei 3-7 Tage alten Albinoratten mit und ohne Kallikreinbehandlung (Dosis 100 IEK/kgKG)

Anzahl der Quadrate
mit Spermato-
cytenprophasen

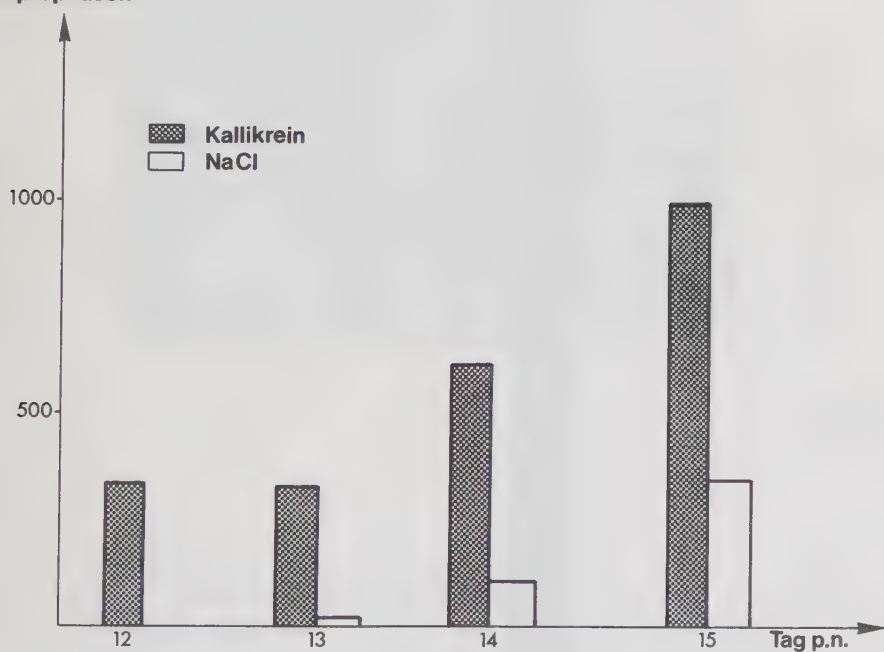


Diagramm 3: Relative Anzahl der Spermatozytenprophasen (Treffer-
methode) im Hoden von 12-15 Tage alten Albinoratten
auf $4,08 \text{ mm}^2$ Meßfläche. Schwarze Säule = Kallikrein-
gruppe, weiße Säule = Kontrollgruppe (NaCl)

Absolute Anzahl
der Spermato-
cytenprophasen

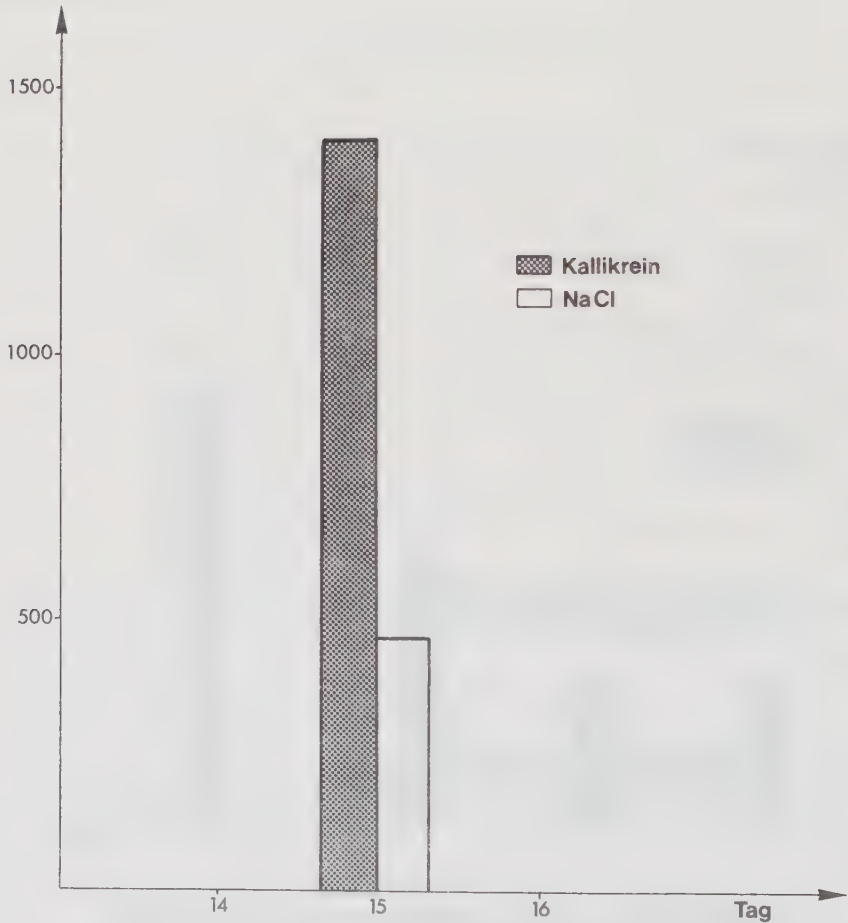


Diagramm 4: Absolute Anzahl der Spermatozytenprophasen im Hoden
15 Tage alter Albinoratten auf $4,08 \text{ mm}^2$ Meßfläche.
Schwarze Säule = Kallikreingruppe, weiße Säule = Kontrollgruppe

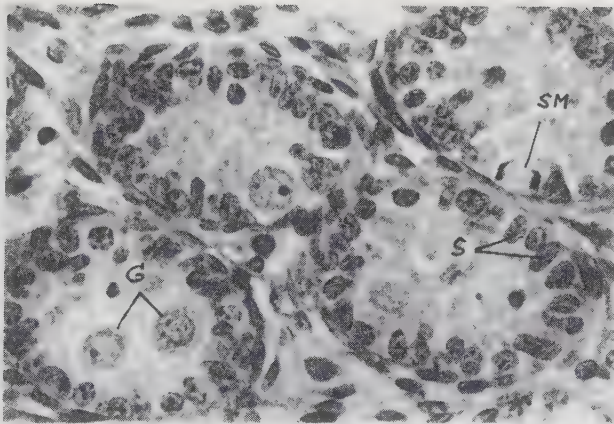


Abb. 1

3. Lebenstag (Kontroll-Gruppe). Keimstränge mit Gonozyten, Sertolizellen u. Sertolizellmitosen. G = Gonozyten, S = Sertolizellen, SM = Sertolizellmitose. Vergr. 50 x 10

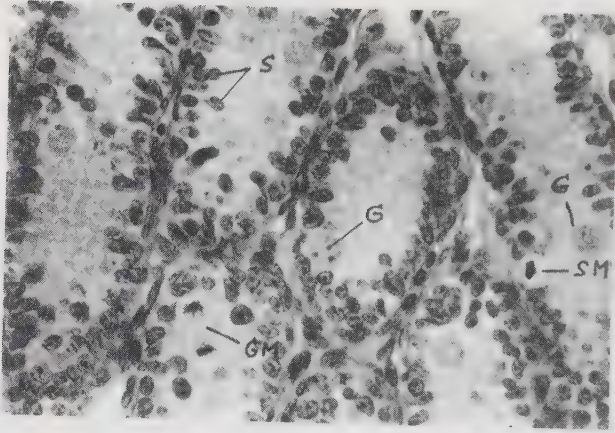


Abb. 2

4. Lebenstag (Kallikrein-Gruppe). Keimstrangbild mit
 Gonozytenmitosen. S = Sertolizellen, SM = Sertoli-
 zellmitose, G = Gonozyten, GM = Gonozytenmitosen.
 Vergr. 50 x 10



Abb. 3

8. Lebenstag (Kontroll-Gruppe). Keimstrangbild mit Spermatogonien und Spermatogonienmitosen. A = A Spermatogonien, I = Im Spermatogonien, S = Sertolizellen, SGM = Spermatogonienmitosen. Vergr. 50 x 10

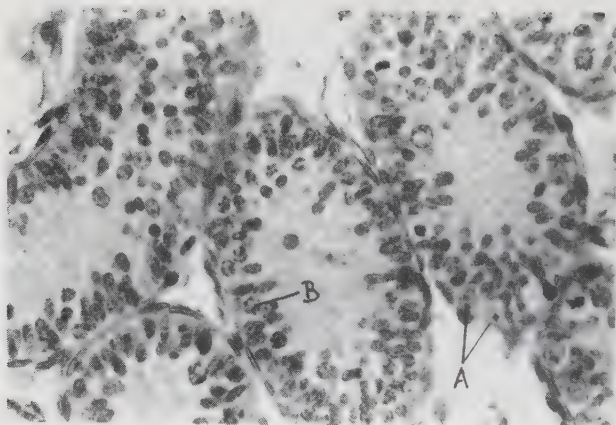


Abb. 4

12. Lebenstag (Kallikrein-Gruppe). A = A Spermatogonien,
B = B Spermatogonien, RSp = ruhende Spermatozyten.

Vergr. 50 x 10

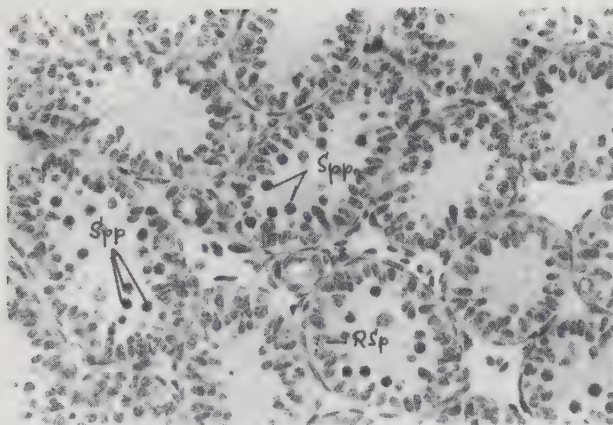


Abb. 5

14. Lebenstag (Kallikrein-Gruppe). Spp = Spermatozytenprophasen, RSp = ruhende Spermatozyten, A = A Spermatogonien. Vergr. 31 x 10

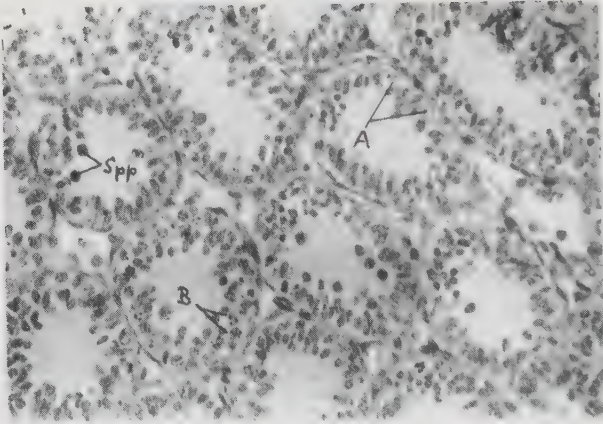


Abb. 6

14. Lebenstag (Kontroll-Gruppe). Spp = Spermatozytenprophasen, A = A Spermatogonien, I = Im Spermatogonien, B = B Spermatogonien. Vergr. 31 x 10

Lebenslauf

10. Juli 1951 Geburt als 4. Kind des Dr.med. Hans Stuttmann und seiner Ehefrau Liesel Stuttmann, geb. Herrmann, in Köln
- 1958 - 1962 Besuch der katholischen Volksschule in Köln-Rodenkirchen
- 1962 - 1970 Besuch des Staatlichen Friedrich-Wilhelm Gymnasiums in Köln, Abitur im Juni 1970
- Wintersemester 1970/71 Beginn des Studiums der Elektrotechnik an der Technischen Hochschule Aachen
- Wintersemester 1971/72 Beginn des Medizinstudiums an der Medizinischen Fakultät der Universität Wien
- Sommersemester 1972 Wechsel des Studienplatzes und Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Erlangen-Nürnberg im 2. Semester
- Ende SS 1972 Vorphysikum in Erlangen
- Ende WS 1973/74 Physikum in Erlangen
- Ende WS 1975/76 1. Teil der ärztlichen Prüfung in Erlangen
7. April 1976 Verheiratung mit Frau Dipl.-Volkswirt Barbara Schleicher
- Ende WS 1976/77 2. Teil der ärztlichen Prüfung
- Ende WS 1977/78 3. Teil der ärztlichen Prüfung
8. Mai 1978 Erteilung der Approbation als Arzt
- Ab 1. Juni 1978 Assistenzarzt auf der anästhesiologischen Abteilung des Marienhospitals in Aachen

Ralph Stuttmann



